



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 873 329 B1**

(51)

Int. Cl.

*A23C 9/146 (2006.01)**A23J 1/20 (2006.01)**C07K 14/79 (2006.01)**C07K 1/18 (2006.01)**C12N 9/08 (2006.01)*(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: E013841	(73) Patendiomanik: Univerzita Palackého Křížkovského 8, 771 47 Olomouc, CZ
(11) Patendikirjelduse tõlke number: EE-EP 2 873 329 B1	(72) Leiutise autorid: Holá, Katerina Horní Hejčínská 51/6, 779 00 Olomouc, CZ
(30) Prioriteediandmed: 15.11.2013 CZ 20130885	Zboril, Radek Jarmily Glazarové 354/9D, 779 00 Olomouc, CZ
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: 27.10.2014	Medrik, Ivo Drahanovice 125, 783 44 Drahanovice, CZ
(96) Euroopa patendi- taotluse number: 14003635.1	(74) Patendivolnik: Riho Pikkor Patendibüroo Turvaja OÜ Liivalaia 22, 10118 Tallinn, EE
(97) Euroopa patendi väljaand- misest teatamise kuupäev: 17.05.2017	
(97) Euroopa patendi number: EP 2 873 329	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: 06.07.2017	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: 15.08.2017	

(54) **Meetod vadakupõhise proteiini separeerimiseks piimapõhisest keskkonnast**

MEETOD VADAKUPÕHISE PROTEIINI SEPARIIRIMISEKS PIIMAPÕHISEST KESKKONNAST

Leiutise kasutusala

Käesolev leiutis seondub piimatööstusega, mis baseerub vadakupõhiste proteiinide, näiteks laktoferriini ning laktoperoksidaasi separeerimisel piimapõhisest keskkonnast, eriti aga värskest piimast, ning mainitud vadakupõhiste proteiinide separeerimisprotsessi tehnilise lahendusega.

Leiutise taust

Laktoferriin ning laktoperoksidaas on vadakupõhised proteiinid, mis omavad võrdset molekulaarkaaluga 78 kDa. Mõlemad eelnevalt mainitud proteiinid on peamiselt esindatud ternespiimas, milles avaldavad vastasündinutele immuunsuskaitset toimet mitmesuguste haigust tekitavate mikroobide vastu.

Seejuures on laktoferriin tuntud kui antibakteriaalne, antiviraalne ning antimikroobne proteiin [Levay, P.F.; Viljoen, M. Hematol. J. 1995, 80, 252-267]. Samal ajal toimib laktoferriin ka antioksüdandina ning aitab vältida kasvaja moodustumist [(a) Gutteridge, J. M.; Paterson, S. K.; Segal, A. W.; Halliwell, B. Biochem. J. 1981, 199, 259-261, (b) Tuccari, G.; Barresi, G. Biometals 2011, 24, 775-784]]. Üldiselt laktoferriini bioaktiivne toime toetab inimeste immuunsussüsteemi. Käesoleval ajal on kaubandusvõrgus saadaval suurel hulgal erinevaid farmatseutilisi tooteid ning toidulisandeid, mis kõik sisaldavad laktoferriini. Harilikult lisatakse laktoferriin toodetele selleks, et tõsta mainitud toodete immuunsustoimet ning samuti sisaldub laktoferriin toodetes, mis on töötatud välja vistrikite eemaldamiseks või kuseteedega seonduvate infektsioonide või aneemia ravimiseks ning samuti on laktoferriin ka üheks koostisosaks toodetele, mis on mõeldud seedetrakti põletikuliste haiguste raviks. Samuti on kaubandusvõrgus saadaval laktoferriin toidulisandina ning on lisatud imikutoidule tähtsa komponendina.

Laktoperoksidaas toimib inimkehas kui antibakteriaalne või kui antioksüdantset toimet omav agent [Ostdal, H.; Bjerrum, M. J.; Pedersen, J. a; Andersen, H. J. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 3939-3944]. Seejuures laktoperoksidaasi lisatakse harilikult

kosmeetilistele toodetele, hambapastadele või suuloputusveele, et ravida parodontoloogilisi haigusi.

- Tänu eelnevalt mainitud laktoferrini ning laktoperoksidaasi mitmesugustele laiaulatuslikele rakendustele, on töötatud välja laialdane valik mitmesuguseid rakendusi mainitud proteiinide suuremahuliseks separeerimiseks piimapõhisest keskkonnast. Seejuures üha suurenenud nõudlikkus mainitud proteiinide puhtuse ning kvaliteedi järgi on tinginud vajaduse rohkem komplitseeritumate ning efektiivsemate separeerimisprotsesside välja töötamiseks. Üldiselt separeeritakse laktoferrin ning laktoperoksidaas veisepiimast. Seejuures laktoferrini kontsentratsioon veisepiimas on ligikaudu 100 mg/l ning laktoperoksidaasi kontsentratsioon veisepiimas on 30 mg/l. Üheks laktoferrini nimetamisväärses eelises on mainitud proteiini termostabiilsus mainitud separeerimisprotsessi teostamisel [Sanchez, L.; Peiro, J. M.; Castillo, H.; Perez, M. D.; Ena, J. M.; Calvo, M. J. Food Sci. 1992, 57, 873-879]. Tänu mainitud laktoferrini termostabiilsusele, on võimalik laktoferrini separeerida ka vadakust, mis on üheks piimatööstuse jääkproduktiks. Kuid seejuures peab mainima, et laktoferrini kontsentratsioon vadakus on nimetamisväärselt madalam (peaaegu kaheksa korda) võrreldes laktoferrini kontsentratsiooniga värskes piimas. Teiselt poolt aga on vähem stabiilse laktoperoksidaasi olemasolu vadakus harilikult denatureeritud, see tähendab, et laktoperoksidaas on vadakus inaktiivses formeeringus.
- Patendis US 4 436 658 on tähelepanu koondatud laktoferrini ning immunoglobuliini separeerimisele vadakust, kasutades seejuures absorptsioonikoloni ränioksiidi geelil vastavalt happelisuse põhilistele tingimustele (pH 7,9-8,5). Seejärel elueeritakse laktoferrin ränioksiidi geelist nii, et muudetakse ioonide madalat pH piirkonda, näiteks ioonide tugevus muudetakse võrdseks 0,5 M happelisuse pH väärtusel 4. Mainitud meetodi kasutamisel elueeritakse laktoferrin koos immunoglobuliiniga ning seetõttu saadud laktoferrini puhtusaste on ligikaudu 70%, kuid harilikult on laktoferrini puhtusaste siiski vaid 50%. Laktoferrini mainitud madal puhtusaste ning rekupereeritud toodangu maht liitri piima kohta on aga kahjuks siiski mittesobiv praktiliseks kasutamiseks laktoferrini suuremahulisele toodangule orienteerudes.
- Seejuures laktoferrini (laktoperoksidaasi) separeerimine teostatakse sageliioonivahetuskromatograafia abil. Mainitud separeerimismeetod baseerub faktil, et piimas

/ vadakus on neutraalse pH korral ainult kaks vähemtähtsat proteiini (laktoferriin ning laktoperoksidaas) positiivse laengu kandjad (nimelt on nende pI arvulised väärtused suuremad kui 7). Seetõttu mistahes muud separeerimismeetodid, näiteks separeerimismeetodid, mis baseeruvad ränioksiidi geelil, geeli kromatograafial, afiinsuse kromatograafial või isolatsioonidel ning samuti separeerimismeetodid, mis baseeruvad spetsiifilisel vastastikusel mõjutusel antikehadega, on leidnud kasutamist vaid minimaalsel määral.

Laktoferriini separeerimist, mis baseerubioonvahetuskromatograafia kasutamisel, on kirjeldatud patendis US 4 791 193. Mainitud laktoferriini separeerimine saavutatakse seeläbi, et teostatakse mitmesugust tüüpi ionivahetuse adsorbentide detailne analüüs mainitud separeerimisjõudluse seisukohast koos isoleeritud laktoferriini puhtuse määramisega. Seejuures on osutunud mainitud separeerimisprotsessi jaoks kõige sobivamateks adsorbentideks ionivahetajad, mis koosnevad (bio)polümeersetest materjalidest, nagu näiteks agaros, agarosdekstraan, hüdroksüülne polümetakrülaad, jne. Kõik eelnevalt mainitud polümeersed materjalid ilmutavad oma pinnal nõrgalt happelist karboksülaadi funktsiooni. Mainitud adsorbentide üheks peamiseks eeliseks on nende kõrge poorsus, mis garanteerib kõrge separeerimisprotsessi jõudluse ning samuti ka mainitud adsorbentide hüdrofiilsus, mis takistab separeeritud proteiinide denaturatsiooni. Seejuures seotud laktoferriin ning laktoperoksidaas elueeritakse minitud proteiinide ioonide tugevuse muutmise kaudu. Nimelt separeeritakse laktoferriin vadakust, kuid samuti separeeritakse laktoferriin ka pastoriseerimata kooritud piimast. Kuid piimatööstuse praktika näitab, et on peaaegu võimatu muuta tehnilist separeerimisprotsessi selles mõttes, et pastoriseerimine teostatakse pärast piima koorimisfaasi. Lisaks eelnevale ei võeta mainitud patendi alusel teostatavas separeerimisprotsessis arvesse, et laktoperoksidaas on seotud sorbendiga koos laktoferriiniga mainitud separeerimisprotsessis ning samuti ei võeta arvesse ka võimalikku laktoferriini reostust laktoperoksidaasi poolt.

Laktoferriini ning laktoperoksidaasi eraldamist ionivahetuskromatograafia abil kirjeldatakse detailselt patendis US 5 516 675. Vastavalt mainitud patendile esitatakse tingimused, mis tagavad sorbendiga seotud individuaalsete proteiinide elueerimise. Seejuures mainitud patendi autorid esitasid mainitud elueerimise teostamiseks mitmesuguseid nõutavaid happelisuse pH väärtusi ning samuti ka mitmesuguseid ioonide

tugevuse väärtusi. Vastavalt mainitud patendile elueeritakse esmalt laktoperoksidaas pH väärtuse 5 juures, kasutades ioonide tugevuse väärtust 0,5 M. Seejärel elueeritakse immunoglobuliin pH väärtuse juures ligikaudu 7 ning võrratuse $I \leq 0,5$ M kehtivusel, kuid seejuures seotakse ainult väike kogus immunoglobuliini, sest enamus immunoglobuliinist omab isoelektrilist punkti, mis on kõrgem kui 7 ning üldiselt on mainitud immunoglobuliinide kontsentratsioon piimas tühine. Seejärel separeeritakse laktoferriin pH väärtusel 7 ning võrduse $I = 1$ M kehtivusel. Kuid seejuures isoleeritud fraktsioonide (millede kogus on 80% või kõrgem) puhtus, mis saavutatakse naatrium dodeküül sulfaadi polüakrülamiid geeli elektroforeesi abil katalüsaatorina toimiva naatrium dodetsüülsulfaadi kaasabil, on küsitav. Seejuures mainitud naatriumdodeküülsulfaadi polüakrülamiidgeeli elektroforeesi abil on võimalik eraldada üksteisest laktoferriin ning laktoperoksidaas. Lisaks eelnevale tuleb aga mainida, et puhvrite potentsiaalne kasutus elueerimisel võib osutada problemaatiliseks suuremahulises tootmisprotsessis.

Ühes teises käesoleva leiutise seisukohast olulises patendidokumendis US 5 596 082 kirjeldatakse eelnevalt mainitud meetodeid tingimustes, milles laktoferriini / laktoperoksidaasi separeerimine teostatakseioonvahetuse sorbendi abil, mille partiklite mõõtmed on suuremad kui 100 μm , harilikult 300 μm (seejuures mainitud elueerimine teostatakse gradiendipõhise ioonide tugevusel neutraalsel pH väärtusel). Tänu kolonn-sorbendi sobivatele parameetritele, võivad laktoferriin ning laktoperoksidaas läbida kolonni suurel kiirusel (600 kordne kolonni maht tunnis). Mainitud kõrge vookiirus on kasulik mainitud separeerimisprotsessis, milles separeeritud agent on esindatud mainitud keskkonnas vaid väikeses kontsentratsioonis nagu näiteks laktoferriin ning laktoperoksidaas piimas. Kuid kahjuks mainitud tehniline lahendus ei võimalda teostada laktoferriini ning laktoperoksidaasi separeerimist pastoriseerimata-piimapõhisest keskkonnast.

Üheks teiseks võimaluseks kuidas teostada laktoferriini ning laktoperoksidaasi kiire separeerimine, on membraanipõhine separeerimisprotsess. Mainitud membraanipõhise separeerimisprotsessi kestel läbib vada membraanide süsteeme, mis funktsioneerivad koos tüüpiliste ioonvahetusega funktsionaalsete rühmadega ($-\text{OS}_3\text{H}$), ($-\text{COOH}$), etc. mainitud separeerimismeetodit kirjeldatakse proteiinide separeerimisele pühendatud publikatsioonis (Hatti-Kaul, R. & Mattiasson, B. Marcel Dekker, Inc.: New York, 2003). Kuid mainitud separeerimisprotsess on komplitseeritum teostada piimapõhise keskkonna

või vadakupõhise keskkonna eeltötluse vaatekohast, sest separeerimislüli blokeerumine võib mainitud separeerimisprotsessi teostamisel toimuda sagedamini kui kolonni seadistus. Seetõttu võib osutada mainitud separeerimisprotsessi teostamine värskest piimast peaaegu võimatuks.

- 5 Edasised patendidokumendid, mis on suunatud laktoferrini ning laktoperoksidaasi suuremahulisele separeerimisprotsessile laiendavad ainult juba eelnevalt kirjeldatud protsesse ning meetodeid. Näiteks vastavalt patendidokumendile US 7 932 069 saavutatakse puhtama laktoperoksidaasi tootmine tänu lisandite pretsipitatsioonile ultrafiltreerimise kestel. Üheks teiseks näiteks on patendidokument US 5 919 913, milles
- 10 inim-laktoferrini separeerimine piimast saavutati sellega, et kasutati transgeenselt modifitseeritud lehmasid. Seejuures mainitud proteiinide tootmise üheks oluliseks etapiks on saadud lahuste puhastamine ultrafiltreerimise abil, millele järgneb kas kuivatusprotsess või vastav dehüdratsiooni protsess (pulbrilise väljundi moodustamiseks). Mainitud protsesse on sobiv kombineerida omavahel, et vältida separeeritud proteiinide kvaliteedi
- 15 langust, see tähendab, et vältida puhastatud proteiinide denaturatsiooni. Mainitud puhastusprotsessi näitena võib mainida tootmisliini tehnilist lahendust vastavalt dokumendile CZ 23725 U1, milles mainitud separeerimisprotsesside optimeerimine tagab separeeritud proteiinide minimaalse degradatsiooni.

- Ilmneb, et tehniliselt korrektselt teostatud separeerimisprotsesside kaudu on võimalik
- 20 saavutada laktoferrini ning laktoperoksidaasi fraktsioonidele küllaldane kvaliteet. Kuid seejuures peamiseks võtmeparameetrik on mainitud proteiinide separeeritud kogus töödeldud piima koguse kohta ning samuti ka separeeritud laktoferrini ning laktoperoksidaasi kvaliteet. Seejuures mõlemad mainitud parameetrid sõltuvad peamiselt piimapõhise keskkonna tüübist, mida kasutati separeerimisprotsessi teostamiseks.
- 25 Vadakupõhise separeerimisprotsessi eeliseks on mainitud separeerimisprotsessi teostamise väike maksumus, kuid teiselt poolt on saadud laktoferrini kontsentratsiooni tase madal ning lisaks eelnevale on laktoperoksidaasi osakaal mainitud separeerimisprotsessis tühine. Seevastu laktoferrini kontsentratsioon kooritud piimas on kõrge, kuid laktoperoksidaasi kvaliteet ning kontsentratsioon sõltub aga piimapõhise
- 30 keskkonna pastoriseerimise tüübist. Piimatööstuses on sobivam teostada aga pastoriseerimist selliselt, et saavutatakse täielikult denaturaliseeritud laktoperoksidaas. Lisaks eelnevale peab kooritud piim läbima komplitseeritud eeltötluse enne mainitud

separeerimisprotsessi teostamist selleks, et vältida kolonnide või membraanide ummistumist.

5 Separeerimisprotsessi keskkonnaga seonduvat käsitletakse patendidokumendis US 2005/0220953 A1. Mainitud patendidokumendis kirjeldatakse, kuidas piima töötlemisel on võimalik saada kontsentreeritud laktoferriini lahust. Laktoferriini madal kontsentratsioon vadakus on kaseiini pretsipitatsiooni tagajärg juustu ning kodujuustu tootmisel. Kuna laktoferriin omab vastaslaengut kaseiini suhtes, siis laktoferriin ning kaseiin toimivad vastastikuse ioonide tugevuse toimele ning seovad laktoferriini setted sadestunud kaseiiniga. Mainitud patendidokumendis kirjeldatakse kuidas vabastada 10 kaseiiniga seotud laktoferriin kaseiinist tugeva ioonide abil, näiteks kasutades naatriumkloriidi lahuseid. Seejuures saadud lahust tuleb eeltöödelda enne kromatograafilist töötlust, et eemaldada ka ülejäänud naatriumkloriid. Sadestunud kaseiini on vaja samuti puhastada naatriumkloriidi lahusest enne järgnevat kasutamist. Tänu eelnevalt mainitud protsessile suureneb rekupereerimise tase ning seetõttu on võimalik 15 saada hea kontsentratsiooniga laktoferriini lahus. Selle tulemusena lüheneb kromatograafiliseks separeerimiseks vajalik ajaline kestvus, kuid teiselt poolt on mainitud protsess tehnoloogiliselt väga nõudlik. Lisaks eelnevale on võimalik mainitud protsessis kasutada vaid piiratud hulk juba pastoriseeritud piima.

Selleks, et täita kõik tingimused efektiivseks laktoferriini ning laktoperoksidaasi 20 separeerimiseks (puhtus, kvaliteet ning küllaldane separeerimistase), on sobivaks separeerimise mooduseks ionvahetuskromatograafial põhineva meetodi kasutamine, mis baseerub otseselt värskel piimal. Kuid värskel piim sisaldab aga rasvagloobuleid (suurusega kuni 10 μm), mis blokeerivad separeerimislüli (kolonn, membraan). Vastavas erialases kirjanduses on mainitud probleemile pühendatud mõningad kirjutised, milledes 25 värskel piim sisestatakse separeerimisprotsessi kolonni temperatuuril 37 °C [C.J. Fee and A. Chand, Sep. Purif. Technol., 2006, 48, 143-149]. Mainitud temperatuuril läheb rasv üle vedelasse olekusse ning seetõttu välditakse kolonni ummistumine. Kuid seejuures tuleb mainida, et tööstuslikul tootmisel on piima soojendamine temperatuurini 37°C mitte realistlik võimaliku bakterliku proliferatsiooni tõttu.

30 Laktoferriini ning laktoperoksidaasi separeerimine teostatakse väga sageli ka paksendatud kihis teostatud absorptsiooni abil. Eelmainitud tehnoloogia baseerub suurt tihedust

omaval sorbendil, mis sadestub kiiresti gravitatsiooni väljas. Seejuures separeerimisprotsessi keskkond pumbatakse sadestunud sorbendi partiklitest ülespoole ning mainitud partiklid hoitakse keevkihis, et saavutada sisestatud separeerimisprotsessi keskkonna kiire adsorptsioon. Patendidokumendis EP 2272378 esitatakse sorbendid koos

5 mittemagnetilisest roostevabast terasest südamikuga paksendatud kihis teostatavaks adsorptsiooniks. Patendidokumentides WO 99/65586 ning EP 1087828 esitatu seondub üldiselt proteiinide paksendatud kihis teostatud adsorbeerimisega. Patendidokumendis US 5516675 esitatakse laktoferriini separeerimine puhtusastmega 92-95%, mis teostatakse naatrium dodeküül sulfaadi polüakrülamiid geeli elektroforeesil põhineva meetodi abil,

10 mis aga ei ole võimeline eristama üksteisest laktoferriini ning laktoperoksidaasi. Brown'i ning teiste autorite artiklis, mis avaldati ajakirja Biotechnology and Bioengineering (biotehnoloogia ja biotehnika) 2013 aastakäigu köite 110 lehekülgedel 1714 - 1725, kasutatakse magnetilist mittepoorset sorbenti ning seeläbi saavutatakse vähese tootlikkusega ning madala puhtusastmega laktoferriin. Patendidokumentides

15 CN101032671, US 4976865 ning EP 0352678 esitatakse mitmesugust tüüpi seadmed, mis on sobivad vadakus leiduva proteiini separeerimiseks sorbentidel põhineva adsorptsiooni abil.

Üheks mõistlikuks meetodiks kuidas eraldada laktoferriin ning laktoperoksidaas värskest piimapõhisest keskkonnast, on eelnev piima proteiini kontsentraadi separeerimine.

20 Seejuures piima proteiini kontsentraat eraldatakse mikrofiltreerimise ning ultrafiltreerimise kombineeritud rakendamise abil. Mainitud mikrofiltreerimisega eraldatakse piimapõhisest keskkonnast rasv ning kaseiin, mida järgnevalt edasiselt töödeldakse. Seejuures töödeldud vadakupõhised proteiinid kontsentreeritakse ultrafiltreerimise abil selleks, et saada sobiv kogus vajalikku piimapõhist keskkonda

25 laktoferriini ning laktoperoksidaasi separeerimiseks. Kuid kahjuks on eelmainitud tehnoloogiline protseduur erakordselt kulukas ning protseduuri tehnoloogia suhtes nõudlik ning lisaks eelnevale ka on liigselt komplitseeritud rakendada mainitud tehnoloogilist protseduuri piimatööstuse praktikas.

Üheks teiseks potentsiaalseks alternatiiviks proteiinide separeerimisel piimapõhisest

30 keskkonnast on magnetiline separeerimine, mis annab võimaluse teostada mainitud separeerimisprotsess komplektse protseduuri abil. Mainitud protseduuri eeliseks on, et vajalikud substantsid isoleeritakse sorbendi mehhaanilise segamise abil piimapõhise

keskkonna kogumahu ulatuses. Vastavalt eelnevale kirjeldusele saavutatakse selliselt võimalus proteiinide separeerimiseks, mis on teostatav heterogeenses keskkonnas ning kasutatavat magnetilist sorbenti on võimalik edasiselt eemaldada välise magnetvälja abil. Seejuures mainitud piimapõhine keskkond ei pea läbima kogu separeerimislüli (kolonn, 5 membraan). Mainitud tehnoloogiline etapp on harilikult ajaliselt sõltuv piimapõhise keskkonna mahust. Seetõttu tundub magnetiline separatsioon ajalisest aspektist lähtuvalt efektiivse lähenemisena, mida võib kasutada isegi mittehomoogeenses piimapõhises keskkonnas.

Seejuures mitmesuguste bioaktiivsete substantside separeerimiseks kasutatavaks sorbendi 10 materjaliks on harilikult nanopartiklid või mikropartiklid, mis baseeruvad raudoksiidil (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Mainitud partiklid on harilikult kaubandusvõrgus saadaval või mainitud partikleid on võimalik separeerida lihtsat sünteetilist lähenemismeetodit kasutades. Eksisteerib laialdane valik mitmesuguseid meetodeid mainitud partiklite pinna 15 funktsionaliseerimiseks. Nimelt on võimalik kaasata mitmesugust tüüpi pindaktiivseid polümeerseid substantse, mida järgnevatel etappidel on võimalik modifitseerida. Tänapäeval laialdaselt kasutatavad põhilised separeerimisprotsessid magnetiliseks separeerimiseks ning proteiinide puhastamiseks on esitatud ka vastavas erialases kirjanduses [Safarik, I.; Safarikova, M. BioMagn. Res. Technol. 2004, 17, 1-17].

Seejuures fundamentaalne panus magnetilise separeerimistehnoloogiate arendusse tehti 20 Saksa Liitvabariigis Karlsruhe's, mis on hästi kirjeldatud ka vastava suunitlusega patendidokumendis US 6942806. Mainitud meetodit tuntakse nimetuse all "kõrge gradiendiga magnetpüümis". Mainitud meetod on spetsiifiline magnetilistel partiklidel põhinev separeerimismeetod, mis baseerub sorbendi partiklite hõljutamisel ümberlülitatava püsimagneti magnetväljas. Seejuures mainitud kõrge gradiendiga 25 magnetpüümise tähtsaks komponendiks on magnetiline sorbent. Mainitud magnetiline sorbent peab vastama seejuures järgmistele parameetritele: mainitud sorbendis kasutatavad partiklid peavad omama madalat poorust soovitud substantside kiireks adsorbeerimiseks (ajalise kestvusega kuni 5 minutit) ning supermagnetismi (jäähmagnetismi puudumine), mis tagab kõrgetasemelise dispersiooni pärast 30 separeerimist. Edasisteks nõudlikeks parameetriteks on suure ulatusega pindkõrgetasemeline separeerimisjõudlus ($20 \text{ až } 100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ning mainitud partiklite mõõtmed peavad olema suuremad kui 500 nm kiireks reageerimiseks magnetväljas või

selleks, et tagada võimalus sorbendi mehhaaniliseks separeerimiseks filtrite abil [Franzreb, M.; Siemann-Herzberg, M.; Hobley, T. J.; Thomas, O. R. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 70, 505-516].

Eelmainitud tehnoloogia on leidnud samuti kasutust ka laktoferriini ning
5 laktoperoksidaasi separeerimiseks. Seejuures magnetilise sorbendina kasutati raudoksiidi nanopartikleid superparamagnetiliste pakettpartiklitenä, mis moodustati Massart'i pretsipitatsioonil põhineva tehnoloogia abil. Mainitud pakettpartikleid funktsionaliseeriti seejuures tugevalt happelise sulfinaatide rühmaga (-OSO₃H) nõudlike sünteetiliste protseduuride tarbeks. Parim jõudlus, mis saavutati mudeliks olevale proteiinile
10 (lüsosüüm), oli 230 mg proteiini 1 grammi sorbendi partiklite kohta toatemperatuuril. Kuid laktoferriini puhtus osutus seejuures mitteküllaldaseks, sest ei olnud võimalik isoleerida laktoferriini ning laktoperoksidaasi üksteisest eraldatult [(a) Heebøll-Nielsen, A.; Justesen, S. F. L.; Hobley, T. J.; Thomas, O. R. T. *Sep. Sci. Technol.* 2004, 39, 2891-2914, (b) Heebøll-Nielsen, A.; Justesen, S. F. L.; Thomas, O. R. T. *J. Biotechnol.* 2004,
15 113, 247-262].

Üheks teiseks tehniliseks võtteks, mida kasutati selleks, et separeerida laktoferriini, on afiinne magnetiline separeerimine magnetiliste nanopartiklite abil koos lisatud hepariiniga. Mainitud sorbendi partiklid omavad jõudlustaset 164 mg laktoferriini 1 grammi partiklite kohta temperatuuril 37 °C. Eelnevalt tulenevalt tänu spetsiifilisele
20 vastastikusele toimele on mainitud partiklid võimelised adsorbeerima nimelt laktoferriini, mis edasiselt elueeriti naatriumkloriidi lahuse abil [Chen, L.; Guo, C.; Guan, Y.; Liu, H. *Sep. Purif. Technol.* 2007, 56, 168-174]. Kuid seejuures tuleb mainida, et mainitud sorbendi partiklite madal jõudlustase ning kõrge maksumus ei võimalda protsessi laiendamist suurtootmise alustamiseks.

25 Eelnevalt esitatu põhjal võib järeldada, et magnetiline separeerimine, mis baseerub pakettsepareerimisel, omab suurt potentsiaali biomakromolekulide suuremahuliseks separeerimiseks algsest mittehomogeensest piimapõhisest keskkonnast. Mainitud separeerimistehnoloogia omab potentsiaali ületada traditsioonilised kromatograafiliste separeerimistehnoloogiatega saavutatud tootmistasemed tänu separeerimis-protsessi
30 lihtsusele ning separeerimiskeskonna eeltötlusele esitatavate madalatasemeliste nõudmiste tõttu. Kuid kuni käesoleva ajani ei võimaldanud laktoferriini magnetiline

separeerimine toota kõrge puhtusastmega madalate majanduslike ning tehnoloogiliste nõudmistega laktoferrini ning samal ajal mainitud protsessis tagada laktoferrini separeerimine värsket piimapõhisest keskkonnast suuremastaapses koguses. Seetõttu on käesoleva leiutise eesmärgiks esitada uus strateegia laktoferrini ning laktoperoksidaasi separeerimiseks piimapõhisest keskkonnast, mis võimaldab mainitud proteiine eraldada mitmesugust tüüpi piimapõhisest keskkonnast. Eelnevast tulenevalt on võimalik käesoleva leiutisega esitatud meetodit rakendada piimatööstuses mitmesugust tüüpi piimapõhiste toodete valmistamiseks.

Leiutise kokkuvõte

10 Käesoleva leiutise eesmärgiks on separeerimisprotsess vadakupõhiste proteiinide laktoferrini ning laktoperoksidaasi separeerimiseks sorbentide abil piimapõhisest keskkonnast, eelistatult aga värskest piimast või vadakust, kusjuures mainitud piimapõhine keskkond kontakteerub sorbendiga mehhaanilise segamise abil, mainitud sorbent on seejuures poorne ning magnetiliselt filtreeritav, valmistatud polümeersest materjalist ning funktsionaliseeritav kationivahetusrühmade abil, mis selekteeritakse järgmistest kationivahetusrühmadest: (-COO-), (-OSO₃-), (-PO₃²⁻-), and (-OPO₃²⁻-), kusjuures mainitud sorbent sisaldab magnetilist osapoolt, mis koosneb anorgaanilistest metalsetest segudest või nullvalentsetest metallidest ning mainitud sorbenti hoitakse seejuures suspensioonis paiknevas eraldi asuvas filtreerimisruumis koos

15 filtreerimismehhanismiga, eelistatult filterkorvis ning mainitud sorbent adsorbeerib vadaku proteiine, vastavalt millele filtreerimismehhanism koos adsorbeeritud proteiinidega separeeritakse ning pärast mitteseotud proteiinide ning muude mittevajalike piimapõhise keskkonna koostisosade väljapesu elueeritakse seotud vadakupõhised proteiinid, kusjuures pärast mitteseotud proteiinide eemaldamist deioniseeritud vee abil,

20 vabastatakse adsorbeeritud vadakupõhised proteiinid sorbendist ioonide tugevust kasutades.

Juhul kui mainitud piimapõhine keskkond sisaldab laktoferrini ning laktoperoksidaasi, elueeritakse laktoperoksidaas ning muud lisandid nagu näiteks immunoglobuliin mainitud separeerimisprotsessi esimesel etapil ioonide tugevuse tasemel 0,01-0,3 mol/dm⁻³ ning seejärel elueeritakse laktoperoksidaasi jääk ioonide tugevusel 0,05-0,5 mol/dm⁻³ ning

30

järgnevalt elueeritakse laktoferriin ioonide tugevusel $0,5-5 \text{ mol/dm}^{-3}$, mis seejärel töödeldakse pulbrilisele kujule.

Seejuures vadakupõhiste proteiinide adsorbeerimisprotsess teostatakse ajalise kestvusega 0,1 kuni 24 tundi, optimaalsel juhul aga ajalise kestvusega 2 kuni 6 tundi temperatuuril 1 -
5 85 °C, kasutades sorbenti, mis valitakse kationivahetusrühmadest nagu näiteks (-COO-) või (-OSO³⁻) või (-PO₃²⁻) või (-OPO₃²⁻) ning mainitud sorbent sisaldab magnetilist osapoolt, mis koosneb anorgaanilistest metalsetest segudest või nullvalentsetest metallidest, eelistatult raudoksiidi kahe- või kolmevalentsetest magnetilistest partiklitest, valikuliselt aga teostatakse mainitud adsorbeerimine eelnevalt mainitud sorbentide segu
10 abil.

Kasutatud sorbent pestakse korduvalt pärast mainitud protsessi vees või lahuses, mis vabastab mitteseotud proteiinid ning mittevajalikud piima koostisosad. Seejuures seotud proteiinid vabastatakse pärastpoole ioonide tugevuse kaasabil. Laktoperoksidaas ning lisandid nagu näiteks immunoglobuliinid, elueeritakse protsessi esimesel etapil ioonide
15 tugevuse väärtusel $0,01-0,3 \text{ mol/dm}^{-3}$, seejärel laktoperoksidaasi jääk elueeritakse ioonide tugevusel $0,05 \text{ kuni } 0,5 \text{ mol/dm}^{-3}$ ning pärast seda elueeritakse laktoferriin ioonide tugevusel $0,5-5 \text{ mol/dm}^{-3}$, kusjuures mainitud ioonide tugevus sõltub kasutatava sorbendi happelisusest.

Optimaalse variandi korral töödeldakse separeeritud proteiine pärastiselt pulbrilisele
20 kujule diaultrafiltreerimise abil, või külmutus-kuivatuse või pihustus-kuivatuse abil ning mainitud sorbent regenereeritakse veega ning kemikaalidega pestes või temperatuuripõhise steriliseerimisega, et kasutada mainitud sorbenti korduvalt mainitud separeerimisprotsessis.

Käesoleva leiutisega esitatud meetodi viimase eelisena võib veel mainida seda, et
25 magnetilise sorbendi kasutamine hõlbustab piimapõhise keskkonna voolamist edasiste tehnoloogilise protsesside tarbeks läbi magnetilise separaatori.

Mainitud protsessi saab teostada separeerimisseadmes, milles separeeritakse vadakupõhised proteiinid (mainitud separeerimisseade ei moodusta aga käesoleva leiutisese koostisosa). Mainitud separeerimisseade sisaldab hoiustustsisterni piimapõhise
30 keskkonna hoiustamiseks koos peamise mehhaanilise segamisseadmega ning äravoolu

torustikuga. Mainitud süsteemi peamiseks ülesandeks on tagada piimapõhise keskkonna
voolamine läbi filtreerimismehhanismi koos sorbendi partiklitega, kusjuures mainitud
voolamine tagab mainitud partiklite lenduvuse piimapõhises keskkonnas. Mainitud
filtreerimismehhanismi võib teostada filterkorvina, mis on uputatud piimapõhisesse
5 keskkonda. Seejuures mainitud filterkorvi on võimalik valmistada roostevabast
traatvõrgust koostatud filtrite abil, kusjuures mainitud traatvõrgu võrgusilmade mõõtmed
sõltuvad kasutatud sorbendi mõõtmetest ning on arvuliselt vahemikus 1 µm kuni 1 cm.

Eelistatult paikneb filtreerimismehhanism hoiustustsisternis või alternatiivse võimalusena
võib filtreerimismehhanismi paigutada väljapool separeerimistsisterni, mis on ühendatud
10 hoiustustsisterniga torustiku kaudu, kusjuures toitepump paikneb hoiustustsisterni ning
separeerimistsisterni vahel ning tsirkulatsioonipump paikneb seejuures
separeerimistsisterni taga.

Optimaalse variandi korral on filtreerimismehhanism varustatud sekundaarse
mehhaanilise segamisseadmega ning magnetiline separaator paikneb separeerimistsisterni
15 taga.

Võrreldes traditsioonilist kromatograafilist kolonni omavate separaatoritega, omab
käesoleva leiutisega esitatud meetodi abil teostatud tehniline lahendus suuremat
efektiivsust tänu lihtsamale adsorptsiooni protsessile, milles sorbendi segamine
teostatakse vaid mehhaanilise segamisseadme abil kasutatava piimapõhise keskkonna
20 kogumahu. Seejuures kasutatav sisendkeskkond, näiteks värsket piim, piima proteiini
kontsentraat, vadak, jne., ei pea läbima surve all kolonni või membraani nagu see toimub
tüüpilise kromatograafilise separeerimise korral mainitud separeerimisprotsessi
teostamiseks. Eelnevalt esitatust tulenevalt väldib vastavalt käesolevale leiutisele
teostatud tehniline lahendus separatsiooniprotsessi blokeerumist või separatsioonilüli
25 (kolonn, membraan) ummistumist ning separeerimisprotsessi kestvus ei sõltu seejuures
kasutatava piimapõhise keskkonna mahust. Käesoleva leiutisega esitatud meetodil
põhinev separeerimisprotsessi tehniline lahendus võimaldab samuti proteiinide eraldamist
värskest piimast. Tänu eelnevalt mainitud tehnilisele lahendusele on võimalik separeerida
laktoferriin ja laktoperoksidaas parima kvaliteedi ning kvantiteedi tasemega enne
30 pastoriseerimist. Samuti lihtsustub ka elueerimisprotsess. Seejuures elueerimisprotsess
toimub keskkonnas, mille maht on väiksem juhul kui proteiinid vabastatakse sorbendist

elueerimisprotsessi keskkonnast mehhaanilise segamiseadme abil, võrreldes variandiga, milles elueerimisprotsessi keskkond tervikuna läbib kogu separeerimislüli. Vähenenud elueerimisprotsessi keskkonna maht lihtsustab samuti separeeritud proteiinide pärastist järeltöötlust. Võrreldes parimate käesoleval ajal kasutatavate tehnoloogiliste lahendustega (proteiinide kromatograafiline separeerimine piimapõhisest proteiini kontsentratsioonist), tundub käesoleva leiutisega esitatud meetodi järgi teostatud pakettfilterkorvipõhine tehnoloogiline lahendus olema sobiv mitteinvasiivseks rakendamiseks mitmesuguse piimatoodete valmistamiseks piimatööstuses. Seejuures on vastavalt käesoleva leiutisega esitatud meetodi järgi teostatud separeerimisprotsessis toodetud laktoferriini ning laktoperoksidaasi kvaliteet võrreldav traditsiooniliste separeerimismeetoditega toodetud laktoferriini ning laktoperoksidaasi kvaliteediga. Kuid pakettfilterkorvil baseeruv separeerimismeetod, mis kasutab poorseid sorbente, pakub võimalust teostada laktoferriini ning laktoperoksidaasi separeerimist piimapõhise keskkonna laiaulatuslikumast spektrist. Tänu eelnevalt esitatud faktile tundub käesoleva leiutisega esitatud meetodi põhjal teostatud laktoferriini ning laktoperoksidaasi separeerimine sobiva alternatiivina käesoleval ajal kasutatavatele traditsioonilistele separeerimismeetoditele, võimaldades lisaks eelnevale separeeritud proteiinide suuremat toodangut töödeldud piimapõhise keskkonna mahuühiku kohta koos väiksemate tehnoloogiliste nõudmistega kasutatavale separeerimisprotsessile.

20 Jooniste lühikirjeldus

Käesoleva leiutisega esitatud meetodi põhilise tehnoloogilise lahenduse skeem ning mainitud lahenduste konkreetseid teostusi illustreeritakse mainitud kirjeldusele lisatud jooniste abil.

Joonisel 1 on näidatud käesoleva leiutisega esitatud meetodi põhiline tehnoloogiline lahendus koos filterkorviga, mis paikneb hoiustustsisternis.

Joonisel 2 on näidatud alternatiivne tehnoloogiline lahendus, vastavalt millele filterkorv paikneb separeerimistsisternis.

Joonisel 3 on näidatud magnetilise kationvaheti koos (-OSO₃H) funktsionaalsusega separeerimisprotsessi teostamiseks läbi optilise mikroskoobi nähtuna, kusjuures sorbendi partiklite fraktsioon paikneb vahemikus 50 kuni 80 µm.

Joonistel 4 ning 5 on näidatud joonisel 3 esitatud magnetiline sorbent allpool ja ülalpool roostevabast terasest võrgu baasil moodustatud filtrit, kusjuures mainitud võrgu silma suurus on 50 µm.

Joonisel 6 on näidatud laktoferriini maksimaalse separeerimisjõudluse sõltuvus (separeeritud proteiini mass) (-SO₃H) funktsionaalsust omava sorbendi massist.

Joonisel 7 on näidatud laktoferriini maksimaalse separeerimisjõudluse sõltuvus (separeeritud proteiini mass) (-COOH) funktsionaalsust omava sorbendi massist.

Joonisel 8 on näidatud separeeritud proteiinide naatrium dodeküül sulfaadi polüakrülamiid geeli elektroforees, mis teostati vastavalt näite 1 protokollile (I - proteiini markerid kDa skaalal, II - laktoferriini standard, III - proteiinid värskes piimas: immunoglobuliinid, laktoferriin / laktoperoksidaas, veise seerumi albumiin, immunoglobuliinid (suur alamüli), immunoglobuliinid (väike allüli), β-laktoglobuliin, α-laktoglobuliin, IV - proteiinid värskes piimas pärast laktoferriini ning laktoperoksidaasi separeerimist, V - sorbendist vee abil elueeritud proteiinid. VI - primaarne fraktsioon vastavalt näite 1 protokollile, VII - sekundaarne fraktsioon vastavalt protokollile näites 1, VIII - tertsiaarne fraktsioon vastavalt näites 1 esitatud protokollile.

Leiutise kirjeldus

Käesoleva leiutisega esitatud lähenemine tehnoloogilise lahenduse saamiseks laktoferriini ning laktoperoksidaasi separeerimiseks baseerub mainitud proteiinide niinimetatud pakettfilterkorvil põhinevale separeerimisele tüüpiliste kromatograafiliste sorbentide abil värskest piimast, kooritud piimast, vadakust või mingist muust laktoferriini sisaldavast keskkonnast. Mainitud tüüpi separeerimine sisaldab võimalust pakettsepareerimiseks magnetilise separeerimise ühe variatsioonina, see tähendab sorbendi mehhaanilist segamist vastava segamisseadmega piimapõhise toorme koguhulgas ning eelneva järeldusena kasutab mainitud separeerimine tüüpilist kromatograafilist sorbenti, mida võib pärastiselt eraldada piimapõhisest keskkonnast filtreerimise või potentsiaalselt välise magnetvälja abil. Vastavalt eelnevale on võimalus mainitud sorbenti kasutada korduvalt pärast soovitud proteiinide elueerimist.

Käesoleva leiutise eesmärk on saavutatav kui sorbendiks, mida kasutatakse laktoferrini ning laktopeksidaasi eemaldamiseks, on tüüpiline sorbent proteiinide kolonnipõhisteks eemaldamiseks ning mainitud sorbent rahuldab järgnevalt esitatavaid kriteeriume:

- 5 a) kasutatav sorbent baseerub polümeersel materjalil, mis on funktsionaliseeritav tüüpilise kationivahetuse rühmadega, mis on selekteeritud järgmistest kationivahetuse rühmadest (-COO-), (-OSO₃-), (-PO₃²⁻), (-OPO₃²⁻).
- 10 b) Sorbendi polümeerseks materjaliks on eelistatult hüdrofiilne polümeer, mis ei lahustu vees standardsetel tingimustel. Mainitud polümeeri hüdrofiilne tunnusomadus on sobiv proteiinide separeerimiseks, sest mainitud hüdrofiilsus säilitab proteiinide naturaalse formeeringu. Üheks teiseks sorbendi tähtsaks parameetrik on võimalus polümeeri edasiseks funktsionaliseerimiseks tüüpiliste kationivahetuse rühmade jaoks. Eelkõige võib mainitud materjali valmistada polüsahhariidist, mis ei ole vees lahustuv (näiteks agaros, tselluloos ning modifitseeritud dekstraan) või lõplikul kujul hüdrofoobsest orgaanilisest segust, 15 mida harilikult kasutatakse statsionaarse faasina kromatograafilistes kolonnides biomakromolekulide separeerimiseks, näiteks sorbentide separeerimiseks akrüülamiidi, stüreeni, divinüülbenseeni, metakrülaadi, jne., polümeerisatsiooni abil.
- 20 c) Järgmiseks punktiks, mida on vaja täita käesoleva leiutisega esitatud eesmärgi saavutamiseks, on kasutatud sorbentide mehhaaniline stabiilsus ning samuti ka mainitud sorbentide partiklite eelnevalt määratletud suuruslik jaotus. Eelnevalt mainitud nõuded on tähtsad selleks, et sorbent omaks võimet hoida protsessi aktiivsena ning samuti tagab see võimaluse sorbendi järgnevaks eemaldamiseks filtreerimise abil. Edasiseks nõudeks sorbendile on, et eelnevalt mainitud sorbendi partiklid omaks globulaarset kuju ning suurust vahemikus kümnetest kuni tuhandete 25 mikromeetriteni, näiteks jaotusvahemikuga 50 kuni 80 µm või jaotusvahemikuga 80 kuni 150 µm, et oleks võimalik teostada hõlbus filtreerimine mehhaaniliste filtrite abil. Tänu partiklite sfäärilisele kujule omab mainitud sorbent paremat mehhaanilist stabiilsust.
- 30 d) Sfääriliste partiklitega sorbendi üheks teiseks tähtsaks omaduseks on kõrgetasemeline poorsus ning separeerimisjõudlus laktoferrini ning laktopeksidaasi separeerimisel.
- e) Mainitud sorbendiks võivad olla ka mingid polümeersed partiklid koos kapseldatud magnetilise materjaliga (näiteks raudoksiidi magnetilised nanopartiklid

või mingi muu materjal), mis on võimeline reageerima välisele magnetilisele väljale. Mainitud magnetiline osapool võib pärastpoole toimida kui turvalisust tagav mehhanism (mehhaanilisele filtreerimismehhanismile), et tagada pärastine mainitud sorbendi eemaldamine piimapõhisest keskkonnast.

5 Käesoleva leiutisega esitatud meetodi alusel teostatud proteiinide separeerimine on kirjeldatud joonisel 1 (joonisel esitatud seadmestik ei moodusta aga käesoleva leiutise koostisosa) ning mainitud seadmestik koosneb hoiustustsisternist (1) piimapõhise keskkonna, näiteks värsket piima hoiustamiseks koos põhilise mehhaanilise segamiseseadmega (2), kusjuures mainitud filtreerimismehhanism (3) paikneb
10 hoiustustsisternis. Seejuures eelistatud teostuses on filtreerivaks mehhanismiks filterkorp, mis on sisestatud separeerimisprotsessi keskkonda ning valmistatud roostevabast terasest võrgust, mis funktsioneerib filtrina ning mille võrgusilma suurus sõltub sorbendi partiklite suurusest, olles vahemikus 1 µm kuni 1 sentimeetrit. Turvaelemendina toimiv magnetiline separaator (5) on inkorporeeritud pärast väljavoolu torustikku (4) hoiustustsisternist (1)
15 magnetilise sorbendi 100% separeerimiseks piimapõhisest keskkonnast. Tänu piimapõhise keskkonna tsirkulatsioonile hoiustustsisternis (1), tsirkuleerib mainitud piimapõhine keskkond samuti ka filtreerimismehhanismis (3), milles sekundaarne mehhaaniline segamiseade (31) hoiab sorbendi partiklid hõljuvas olekus ning intensiivses kontaktis mainitud piimapõhise keskkonnaga. Seejuures mainitud
20 filtreerimismehhanism (3) väldib mainitud sorbendi otsese kontakti kogu piimapõhise keskkonnaga, kuid siiski võimaldab teatud vastastikuse toime mõlemate mainitud süsteemide vahel.

Mainitud separeerimistehnoloogia alternatiivne seadmestik on kujutatud joonisel 2 (joonisel näidatud seadmestik ei moodusta käesoleva leiutise koostisosa). Seejuures
25 filtreerimismehhanism (3), see tähendab filterkorp, on inkorporeeritud separeerimistsisterni (6), mis on ühendatud torustiku (9) kaudu hoiustustsisterniga (1), kusjuures piimapõhist keskkonda pumbatakse toitepumba (7) abil, millega tagatakse piimapõhise keskkonna tsirkuleerimine mainitud separeerimisprotsessis. Pärastpoole pumbatakse piimapõhine keskkond separeerimistsisternist (6) hoiustustsisterni (1)
30 tsirkulatsioonipumba (8) abil. Seejuures piimapõhise keskkonna voog läbi filtreerimismehhanismi (3) tagatakse pidevalt hoiustatud piimapõhisele keskkonnale enne järgnevat töötusetappi.

Mainitud tehnoloogilise lahenduse, see tähendab laktoferrini ning laktoperoksidaasi separeerimise piimapõhisest keskkonnast või mingist muust laktoferrini sisaldavast keskkonnast pakettfilterkorvil baseerual separeerimismeetodil, kasutades eelmainitud sorbente, mis tagavad laktoferrini ning laktoperoksidaasi suure separeerimisjõudlusega separeerimise, on võimalik teostada vaid mitmete lihtsate operatsioonide abil.

Seejuures on laktoferrini ning laktoperoksidaasi separeerimise primaarseks etapiks mainitud proteiinide adsorbeerimine sorbendi abil, see tähendab, et katioonivahetuse toimel. Mainitud sorbenti segatakse mehhaaniliselt piimapõhise keskkonna / vadakulise keskkonna koguse kogu ulatuses juba eelnevalt. Seejuures separeeritud laktoferrini / laktoperoksidaasi kogus sõltub mainitud proteiinide jaoks kasutatud sorbendi separeerimisvõimekusest ning samuti magnetilise sorbendi kogusest piimapõhise keskkonna koguse suhtes ning samuti piimapõhise keskkonna temperatuurist ning mainitud mõjutuse ajalisest kestvusest.

Mainitud proteiinide sorbeerimist on võimalik teostada otseselt värskest piimast hoiustustsisternis enne järgnevat pastoriseerimise protsessi, koorimist, jne., vastavalt joonisel 1 näidatule. Seejuures ainukeseks tingimuseks on, et filtreerimismehhanism oleks inkorporeeritud hoiustustsisterni koos filterkorviga ning filtreerimismehhanismi skelett oleks kaetud roostevabast terasest võrkfiltriga. Seejuures sorbeerimine tagatakse sorbendi mehhaanilise liigutamise kaudu, vaatamata sellele, et mainitud sorbent on inkorporeeritud filterkorvi ning ei ole võimeline osa võtma järgmisest piima töötlustapist, olles mehhaaniliselt tõkestatud filtriga piima väljastamise protsessis. Samuti on võimalik inkorporeerida magnetiline separaator väljalaske torustiku taha juhu jaoks kui kasutatakse magnetilist separeerimist. Eelnevalt mainitud separeerimisseadme seadistus garanteerib sorbendi 100 % eemaldamise enne järgnevate protseduuride teostamist. Mainitud magnetilised sorbendid on kaubandusvõrgus saadaval ning neid kasutatakse tavaliselt toiduainete tööstuses, näiteks šokolaadi tootmisel.

Mainitud pakettfilterkorvil põhinevat proteiinide eraldamist värskest piimast on samuti võimalik teostada ka ühes teises separeerimisseadme seadistuses vastavalt joonisele 2. Mainitud proteiinide separeerimine baseerub samal printsiibil kui eelnevalt kirjeldatud separeerimine, kuigi kasutatav sorbent paikneb teises tsisternis (ligikaudu kümme korda väiksemate mõõtmetega tsisternis) koos filterkorviga, mis omab vastavat mehhaanilist

segamismehhanismi. Seejuures värske piim mainitud väiksemas tsisternis pannakse tsirkuleerima lisa tsirkulatsioonipumpade abil. Seetõttu saavutatakse, et kogu mainitud protsess on täielikult eraldatud piimapõhisest keskkonnast ning järgnevad piima töötlusprotsessid ei ole seega häiritud. Magnetilist separeerimist võib pärastpoole
5 rakendada turvalisust tagava separatsioonina.

Järgnevat separeerimisprotsessi etappi korratakse koos vee kasutamisega, et eemaldada mitteseotud proteiinid ning muud mittevajalikud piima koostisosad. Järgneval tootmisprotsessi etapil elueeritakse adsorbeeritud proteiinid. Mainitud elueerimist võib teostada analoogselt eelnevalt kirjeldatule, rakendades sorbendi mehhaanilise segamise
10 abil teostatud adsorbeerimist elueerimisprotsessi keskkonnas. Seejuures on võimalik teostada elueerimist väiksemas mahus (isegi rohkem kui kümme korda väiksemas mahus) võrreldes piimapõhise keskkonna mahuga, juba eelnevalt. Laktoferrini ning laktoperoksidaasi on võimalik elueerida sorbendist samal ioonide tugevusastmel, mis leiab rakendust kromatograafilisel separeerimisel. Mittevajalikud immunoglobuliinid
15 (millede isoelektriline punkt on kõrgem kui 7) on võimalik elueerida sorbendist ioonide madalal tugevusastmel, näiteks ioonide tugevusastmel, milles naatriumkloriid pH tasemega 7 jääb vahemikku 0,05 kuni 0,2 mol/dm⁻³, sõltuvalt kasutatud sorbendi happelisusest. Järgnevalt elueeritakse laktoperoksidaas kõrgemal ioonide tugevustasemel, näiteks tugevustasemel, mis jääb vahemikku 0,1 kuni 0,5 mol/dm⁻³ ning
20 laktoferrin elueeritakse naatriumkloriidi lahuse kaasabil, mille ioonide tugevus jääb vahemikku 0,5 kuni 1 mol/dm⁻³. Saadud proteiinide lahused vabastatakse soolast (näiteks dialtrafiltrerimise abil) ning kuivatatakse pulbrilisele kujule (näiteks külmutus-kuivatus protseduuri või pihustus-kuivatus protseduuri abil). Pärast separeerimist pestakse sorbenti veega, steriliseeritakse näiteks keemiliselt või temperatuuri kaasabil, et oleks võimalik
25 mainitud sorbenti taaskasutada korduvalt edasistes separeerimisprotsessides.

Järgnevad näited illustreerivad vaid mõningaid laktoferrini ning laktoperoksidaasi separeerimisprotsessi tüüpe, milles kasutatakse poorseid sorbente vastavalt käesolevale leiutisele. Mainitud näidetes kasutati tselluloosil põhinevat (-OSO₃H) ning (-COOH) funktsiooni omavat magnetilist ionvahetit. Kuid samuti on võimalik kasutada ka muud
30 tüüpi sorbente, mida tavaliselt kasutatakse kromatograafilises separeerimisprotsessis (ilma magnetilise osapooleta). Järgnevates näidetes illustreeritakse kuidas on võimalik separeerida laktoferrini ning laktoperoksidaasi värskest piimast selliselt, et tagatakse

nõutud sorbendi maht piimapõhise keskkonna mahu suhtes ning näidatakse kuidas separeeritud fraktsioonide puhtus sõltub kasutatava sorbendi tüübist ning separeerimisvõimekusest (vastavalt tugevalt happelise funktsiooniga või nõrgalt happelise funktsiooniga sorbent).

- 5 Seejuures laktoferrini ning laktopeksidaasi fraktsioonide puhtusaste määratakse vastavalt konkreetse proteiini kontsentratsiooni tasemele kõikide proteiinide totaalse kontsentratsiooni suhtes. Laktoferrini kontsentratsioon määrati seejuures veise laktoferrini ELISA Kit abil ning laktopeksidaasi kontsentratsioon määrati peroksidaasi (ensümaatilise) aktiivsuse kaudu võrreldes ABTS'ga ning kõikide proteiinide totaalne
- 10 kontsentratsioon määrati Bradfordi analüüsi abil.

Näide 1

Kaubandusvõrgus turustatavat magnetilist tselluloosipõhist sorbenti, mis omab (-OSO₃H) funktsionaalset rühma ning mille partiklite mõõtmete jaotus jääb vahemikku 50 kuni 80

15 µm (0,8 ml kontsentreeritud formeeringus), pesti veega kolm korda ning järgnevalt taasdispergeeriti 50 ml värskes piimas (ilma piima pastoriseerimata). Seejuures resultaadiks saadud suspensiooni pH väärtus oli 6,7. Saadud segu segati toatemperatuuril järgneva 2 tunni vältel. Seejärel eemaldati magnetiline sorbent käsimagneti abil ning pesti seejärel veega kolm korda. Järgnevalt elueeriti adsorbeeritud proteiinid mehhaanilise segamisega (10 minuti vältel), kasutades kolmeastmelist ioonide tugevust (5 ml

20 naatriumkloriidi lahus pH väärtusega 7). Esimesel etapil kasutati laktopeksidaasi ning põhiliste immunoglobuliinide elueerimiseks 0,1 M naatriumkloriidi lahust. Saadud laktopeksidaasi puhtusaste oli 60% ning separeeritud toodangu kogus 1 mg. Teisel etapil saadi 0,6 mg laktopeksidaasi puhtusastmega 85%. Viimasel elueerimisprotsessi etapil elueeriti 4 mg laktoferrini puhtusastmega $\geq 95\%$. Toodetud proteiinide

25 naatriumdodeküülsulfaadi polüakrülamidegeeli elektroforees on näidatud joonisel 3. Kasutatud magnetilist sorbenti pesti pärast protsessi, et sorbenti kasutada korduvalt samadel tingimustel kui seda tehti eelnevalt koos analoogsete tulemitega. Pärast separeerimist testiti kasutatud piima rasvasisaldust ning happelisust. Tuvastati, et nii enne proteiinide separeerimist kui ka pärast proteiinide separeerimist oli piima rasvasisalduse

30 ning happelisuse näitajate arvulised väärtused võrdsed.

Näide 2.

Laktoferriini ning laktoperoksidaasi adsorbeerimine ning elueerimine teostati samadel tingimustel kui seda tehti vastavalt näitele 1. Kuid magnetilist sorbenti segati värskes piimas temperatuuril 2 kuni 8 °C. Mehhaanilise segamise aega aga pikendati kuni 4
5 tunnini. Primaarseks proteiini fraktsiooniks oli laktoperoksidaas (0,8 mg, 65% puhtusaste), sekundaarse fraktsioonina saadi 0,45 mg laktoperoksidaasi puhtusastmega 80% ning kõige viimaseks fraktsiooniks oli 4,2 mg laktoferriini puhtusastmega $\geq 95\%$.

Näide 3.

Laktoferriini ning laktoperoksidaasi adsorbeerimine ning elueerimine teostati samadel
10 tingimustel kui seda tehti vastavalt näitele 1. Kuid muudeti magnetilist sorbenti. Nimelt kasutati tugeva happelisuse funktsiooniga (-OSO₃H) magnetilise sorbendi asemel nõrga happelisuse funktsiooniga (-COOH) magnetilist sorbenti. Seejuures magnetiline ionvaheti omas kõrgemat maksimaalset separeerimisvõimekust laktoferriini separeerimisel (vaata joonist 7). Magnetilist sorbenti (2 ml) kasutati separatsiooni
15 teostamiseks 200 ml värskest piimast. Seejuures adsorbeerimine ning elueerimine teostati vastavalt näite 1 protokollile. Kasutatud strateegia andis primaarseks fraktsiooniks 3,2 mg laktoperoksidaasi (puhtusaste 55%), sekundaarse fraktsioonina saadi 2,9 mg laktoperoksidaasi (puhtusaste 70%) ning tertsiaarse fraktsioonina saadi 12 mg laktoferriini (puhtusaste $\geq 95\%$).

20 Näide 4.

Laktoferriini ning laktoperoksidaasi adsorbeerimine ning elueerimine teostati 200 ml värskes piimaga samadel tehnilistel tingimustel kui seda tehti vastavalt näitele 1. Sorbendina kasutati keskmise happelisuse rühmaga (-O-PO₃H₂) magnetilist ionvahetit.. Primaarseks fraktsiooniks saadi 5 mg laktoperoksidaasi puhtusastmega 45% ioonide
25 tugevusel 0,05 M. Sekundaarseks fraktsiooniks elueeriti 2,8 mg laktoperoksidaasi puhtusastmega 80% ioonide tugevusel 0,2 M. Adsorbeerimise ning elueerimisprotsessi viimasel etapil saadi 15,8 mg laktoferriini puhtusastmega $\geq 95\%$.

Eelnevalt esitatud näited illustreerivad selgelt, et magnetiline separeerimine annab hea tulemi ning mainitud magnetilist separeerimist on võimalik kasutada mitte ainult

vadakupõhise tooraine puhul, milles laktoferrini kontsentratsioon on minimaalne, vaid ka värske piima kasutamisel toorainena. Seejuures magnetiline sorbent, mis omab tugevat happelisuse rühma (-OSO₃H), tundub olema kõige sobivam laktoferrini ning laktoperoksidaasi separeerimiseks piimast, kasutades mehhaanilist segamist (pakettseparatsiooni kasutamisel). Mainitud sorbent on võimeline tagama küllaldase tasemega separeerimisvõimekuse koos separeeritud proteiinide kõrgetasemelise puhtusastmega. Seejuures saadud puhtusastmed on sarnased puhtusastmetele, mis iseloomustavad tänapäeval kasutatavat tööstuslikku kromatograafilist separeerimist. Üheks teiseks tähtsaks mainitud separeerimist iseloomustavaks teguriks on asjaolu, et toorainena kasutatava piima peamised parameetrid jäävad konstantseteks kogu separeerimisprotsessi vältel, see tähendab, et piima happelisus ja rasvasisaldus ning samuti separeeritud proteiinide puhtusaste ning saagikus on reprodutseeritav separeerimisprotsessi tsüklite kordumisel.

Tööstuslik rakendatavus

Käesoleva leiutisega esitatud laktoferrini ning laktoperoksidaasi pakettfilterkorv-separeerimine võib leida rakendust peamiselt piimatööstuses, mis tegeleb mitte ainult piimasaaduste tootmisega, millede näideteks on või, juust, jogurdid, jne, vaid mainitud piimatööstus tegeleb samuti ka bioaktiivsete substantside separeerimisega piimast, millede näiteks võib olla ternespiim. Mainitud puhastatud proteiine võib järgnevalt kasutada toidulisandite, kosmeetikatoodete või ravimite bioaktiivsete komponentide tootmiseks farmaatsiatööstuse tarbeks.

PATENDINÕUDLUS

1. Meetod vadakupõhiste proteiinide laktoferriini ning laktoperoksidaasi separeerimiseks piimapõhisest keskkonnast, eelistatult aga värskest piimast või vadakust sorbentide abil, kusjuures piimapõhine keskkond kontakteerub kasutatava sorbendiga mehhaanilise segamise tulemusena, seejuures kasutatav sorbent on poorne ja magnetiliselt filtreeritav ning valmistatud polümeersest materjalist, mis funktsionaliseeritakse kationivahetusrühma abil, mis selekteeritakse kationivahetusrühmade (-COO-), (-OSO₃-), (-PO₃²⁻-) ja (-OPO₃²⁻-) baasil ning sorbent omab magnetilist komponenti, mis koosneb mitteorgaaniliste metallide segust või null-valentsetest metallidest, kusjuures sorbenti hoitakse hõljuvas olekus separaatses filtreerimisruumis koos filtreerimis-

5 segamise tulemusena, seejuures kasutatav sorbent on poorne ja magnetiliselt filtreeritav ning valmistatud polümeersest materjalist, mis funktsionaliseeritakse kationivahetusrühma abil, mis selekteeritakse kationivahetusrühmade (-COO-), (-OSO₃-), (-PO₃²⁻-) ja (-OPO₃²⁻-) baasil ning sorbent omab magnetilist komponenti, mis koosneb mitteorgaaniliste metallide segust või null-valentsetest metallidest, kusjuures sorbenti hoitakse hõljuvas olekus separaatses filtreerimisruumis koos filtreerimis-

10 mehhanismiga, milleks on eelistatult filterkorv ning sorbent adsorbeerib vadakupõhised proteiinid, mispeale filtreerimismehhanism koos adsorbeeritud proteiinidega separeeritakse ning pärast mitteseotud proteiinide ja mittevajalike piima koostisosadega väljapesemist elueeritakse seotud vadakupõhised proteiinid, kusjuures pärast mitteseotud proteiinide eemaldamist deioniseeritud vee abil vabastatakse adsorbeeritud vadakupõhised proteiinid sorbendist ioonide tugevust kasutades, kusjuures juhul kui piimapõhine keskkond sisaldab laktoperoksidaasi ning laktoferriini, elueeritakse laktoperoksidaas ning piimas sisalduvad lisandid nagu immunoglobuliinid elueerimisprotsessi primaarsel etapil ioonide tugevuse vahemikus 0,01 kuni 0,3 mol/dm⁻³, seejärel elueeritakse ülejäänud laktoperoksidaas ioonide tugevuse vahemikus 0,05 kuni 0,5 mol/dm⁻³ ja seejärel elueeritakse laktoferriin ioonide tugevuse vahemikus 0,5 kuni 5 mol/dm⁻³ ning elueeritud laktoferriin ja laktoperoksidaas töödeldakse järgneva töötuse käigus pulbrilisele kujule.

15

20

2. Vadakupõhiste proteiinide separeerimismeetod vastavalt patendinõudluse punktile 1, kusjuures adsorbeerimine teostatakse ajalise kestvusega 0,1 kuni 24 tundi, eelistatult aga ajalise kestvusega 2 kuni 6 tundi temperatuuril 1 kuni 85 °C.

25

3. Vadakupõhiste proteiinide separeerimismeetod vastavalt patendinõudluse punktidele 1 ja 2, kusjuures adsorbeerimine teostatakse sorbendiga, mille magnetiline osapool koosneb kahe- või kolmevalentse raudoksiidi magnetilistest partiklitest.

4. Vadakupõhiste proteiinide separeerimismeetod vastavalt patendiõudluse punktidele 1 kuni 3, kusjuures separeeritud proteiine töödeldakse pulbrilisele kujule diaultrafiltrimise ning külmutus-kuivatuse või pihustus-kuivatuse protseduuride rakendamisega.
- 5 5. Vadakupõhiste proteiinide separeerimismeetod vastavalt patendiõudluse punktidele 1 kuni 3, kusjuures kasutatav sorbent regenereeritakse pärast separeerimisprotsessi pesemisega veekeskkonnas ning keemilise või temperatuuripõhise steriliseerimisega, et sorbent oleks separeerimisprotsessis korduvalt kasutatav.

Joonis FIG. 6.

Amount of Lf per gram of particles [mg/g] - laktoferrini kogus milligrammides sorbendi partiklite grammi kohta

5 Concentration of unadsorbed protein [mg/ml] - adsorbeerimata proteiini kontsentratsioon [mg/ml]

Data - andmed

Model - mudel

Joonis FIG. 7.

10 Amount of captured Lf per gram of particles [mg/g] - separeeritud laktoferrini kogus milligrammides sorbendi partiklite grammi kohta

Concentration of unadsorbed protein [mg/ml] - adsorbeerimata proteiini kontsentratsioon [mg/ml]

Model - mudel

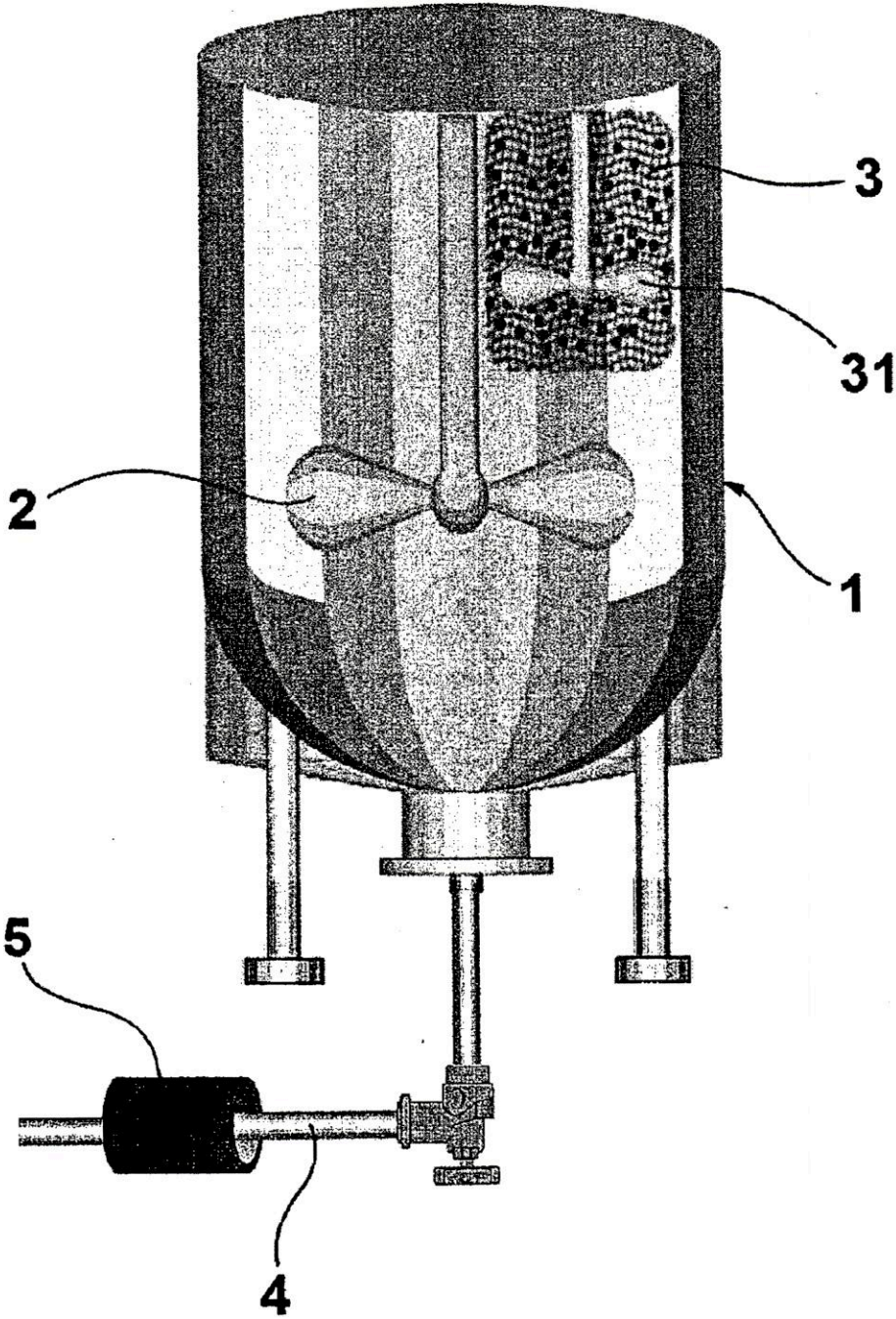


FIG. 1

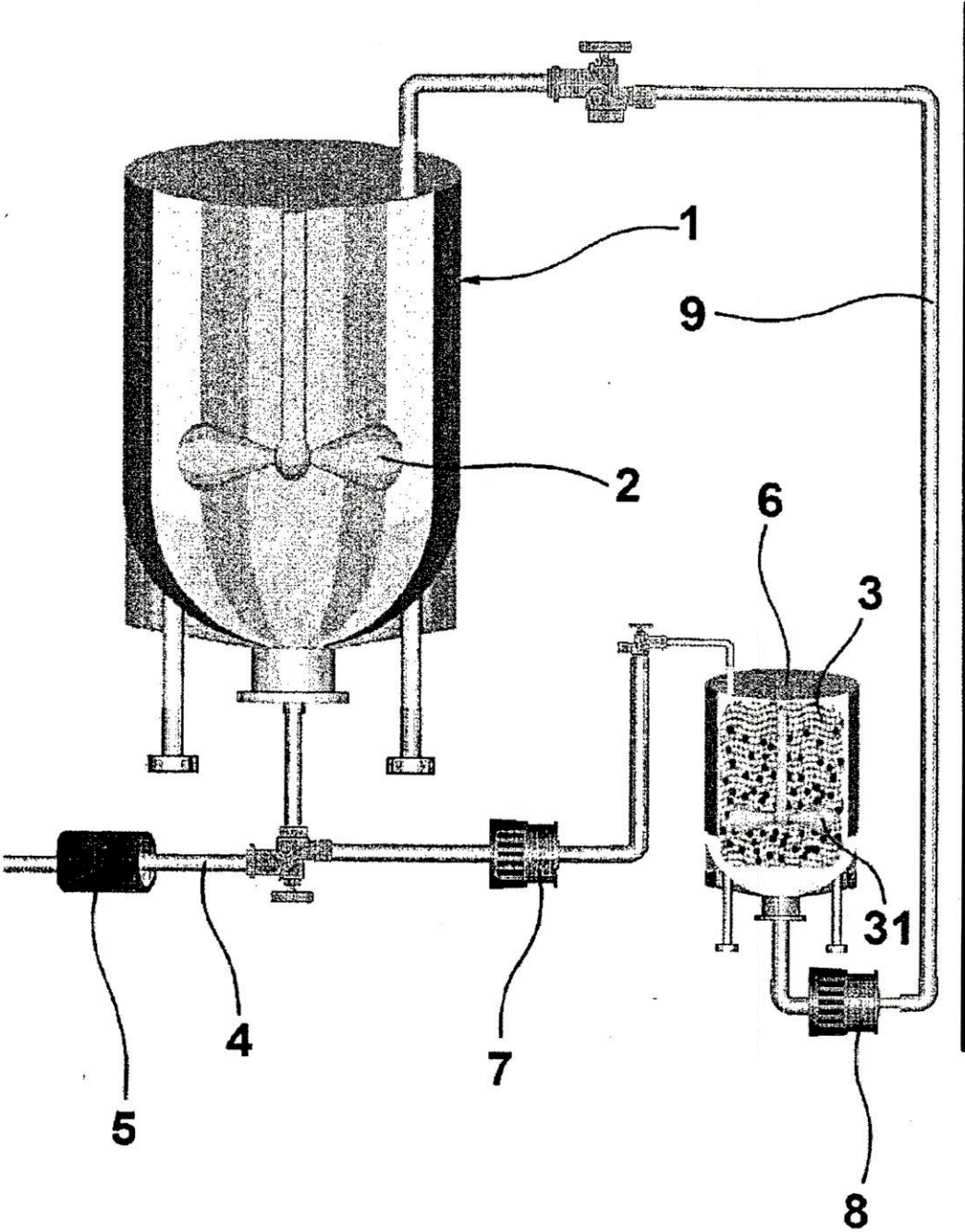


FIG. 2

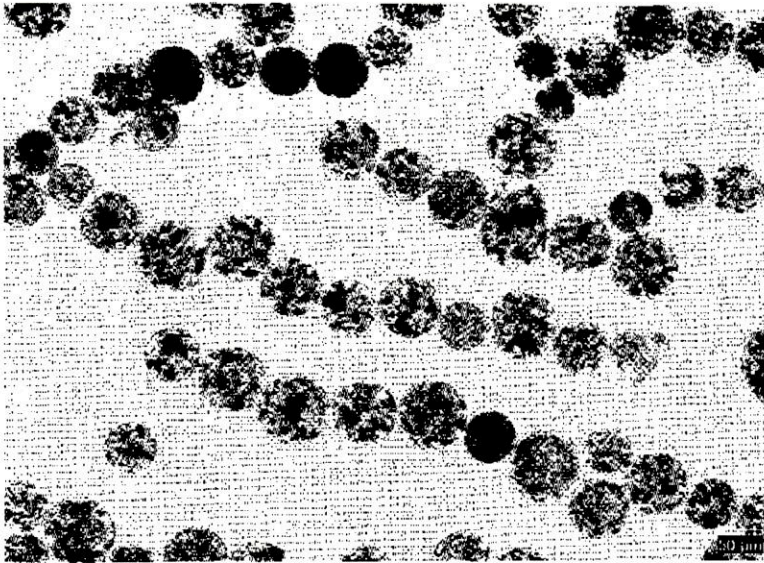


FIG. 3

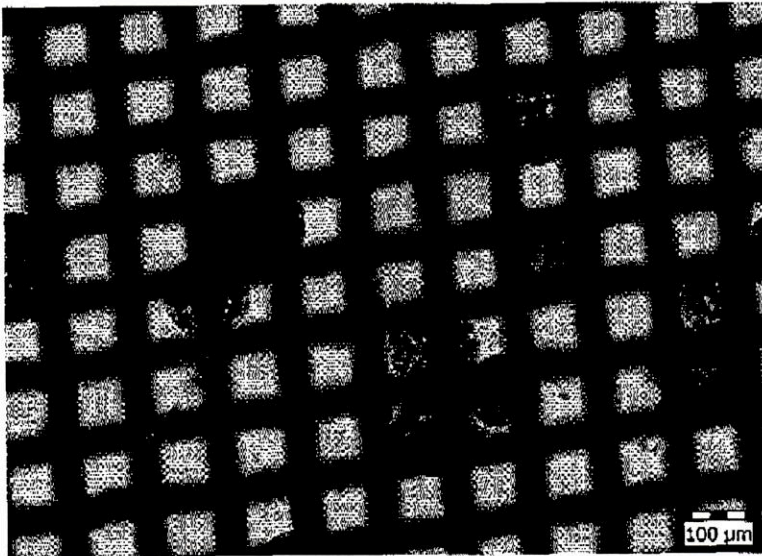


FIG. 4

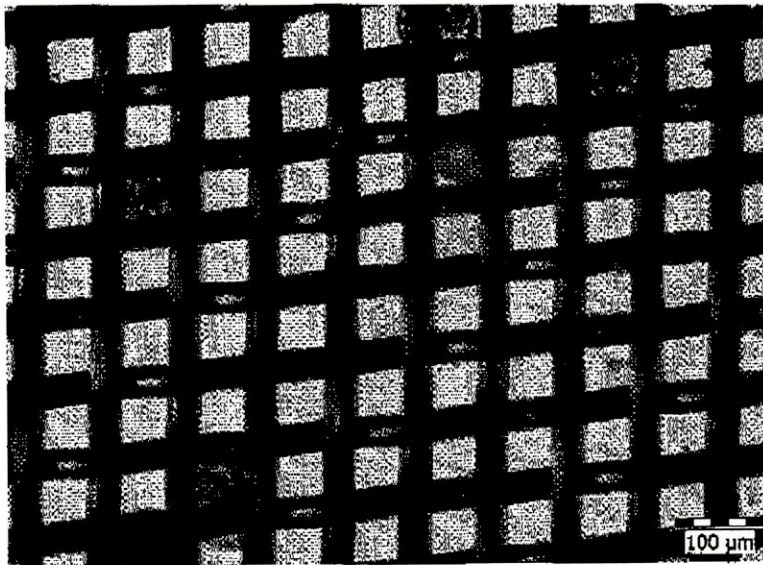


FIG. 5

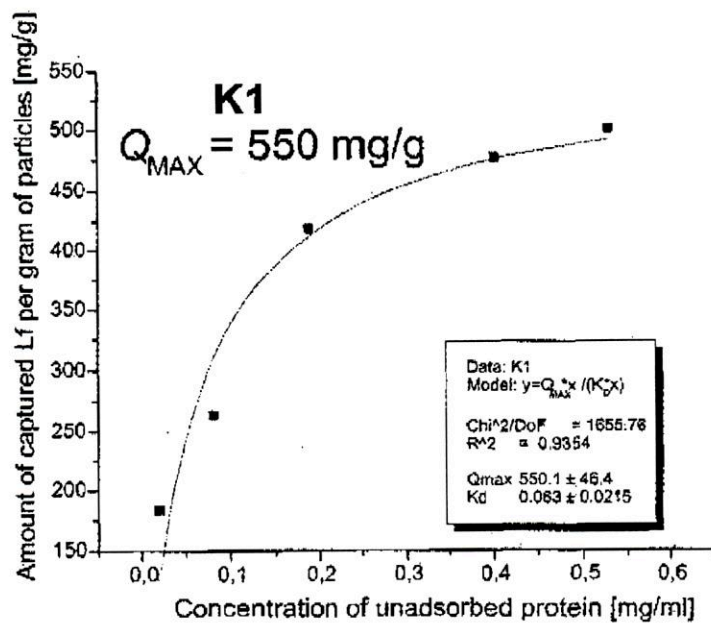


FIG. 6

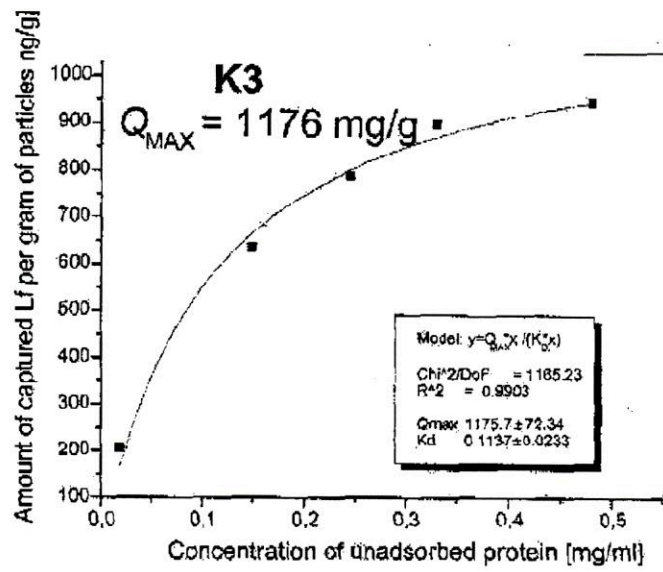


FIG. 7

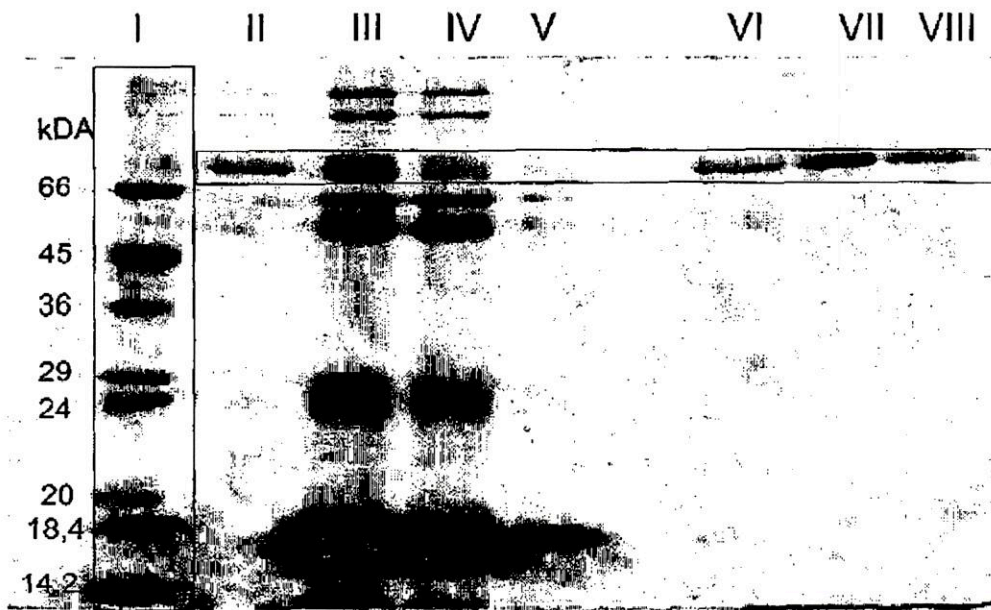


FIG. 8